

MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW  
CENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE  
Directeur a.i.: Dr. Ir. W. Vyncke

# ONDERZOEK VAN DE FAGOCYTOSECAPACITEIT EN PAAISTRESS BIJ SCHAR (*Limanda limanda*)

D. Declerck



MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW  
CENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE

Directeur a.i.: Dr. Ir. W. Vyncke

# ONDERZOEK VAN DE FAGOCYTOSECAPACITEIT EN PAAISTRESS BIJ SCHAR (*Limanda limanda*)

D. Declerck



---

Mededelingen van het Rijkswateringenwetenschappelijk Instituut (CLO Gent)  
Publikatie nr. 240, 1996  
D1996/0889/2

## SAMENVATTING

De methode voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij schar werd onderzocht. Uit de experimenten waarbij de percoll-gradiënten voor de scheiding van de leucocyten werd nagegaan gaf de combinatie :  $d = 1,02$ ;  $d = 1,05$  en  $d = 1,06$  de beste resultaten.

Er werden eveneens proeven op aquariumvis en op levende vis verricht, die onmiddellijk na de landing in het laboratorium werden uitgevoerd. Een protocol werd opgesteld waarbij de behandeling van het monster aan boord van het vaartuig en in het laboratorium wordt beschreven. Uiteindelijk werd de invloed van het paaien bij schar op de fagocytosecapaciteit en de bloedformule nagegaan.

## INLEIDING

Fagocytose is een van de technieken die gebruikt kan worden als indicator voor stressbepaling bij vis (MATHEWS, 1990). Fagocytose, de verslinding van cellen en partikels, biedt vele mogelijkheden in het planten- en dierenrijk, namelijk de opname van partikels van enkele micrometers groot zoals bacteriën of in experimentele situaties zelfs dunne plastieken pareltjes (GREENBERG, 1993)

Fagocyterende cellen hebben een belangrijke functie bij het tot stand komen van de immuunrespons. Tot de fagocyterende cellen behoren zowel de granulocyten, waarvan de neutrofielen in dit kader de belangrijkste zijn als de monocytën/macrofagen. GREENBERG en SILVERSTEIN (1993) noemen de granulocyten polymorf nucleaire leucocyten en de monocytën en macrofagen mononucleaire leucocyten. Monocytën behoren tot het mononucleair - fagocytensysteem. De monocytën zijn de macrofagen van het bloed. Als monocytën het bloed verlaten naar de weefsels worden ze macrofagen genoemd. Monocytën migreren naar weefselplaatsen van infecties of ontstekingen, waar ze differentiëren in macrofagen die gebroken cellen, dode micro-organismen en andere partikels vernietigen (DARNELL et al., 1990).

De verschillende fasen waarbij de fagocytose plaatsgrijpt werden door ROITT en medewerkers (1990) en den OTTOLANDER (1989) beschreven.

Voor de analyses worden voor vis de macrofagen en granulocyten uit de kopnier (pronephros) geïsoleerd. MATHEWS en medewerkers (1990) gaan ervan uit dat de lichtmicroscopische meting van de fagocytose een nauwkeurige en betrouwbare techniek is. Het enige probleem is om opgenomen partikels te onderscheiden van deze die adheren aan het oppervlak van de cel, maar dit kan overwonnen worden door ervaring.

PLASMAN en VRAY (1994) hebben een methode beschreven om de fagocytose- activiteit na te gaan door gebruik te maken van fluorescerende partikels zoals bacteriën, gisten of parels. In een ander experiment hebben PLASMAN en VRAY (1993) peritoneale cellen van muizen gescheiden op 12 fracties van Percoll-gradiënten met een eigen densiteit. SANTAREM en FIGUERAS (1994) hebben de effecten bestudeerd van intraperitoneale injecties van *Pasteurella piscicida* o antigen bij tarbot (*Scophthalmus maximus L.*) LERNOUT en OLLEVIER (1992) hebben de invloed van de voedingslipiden op de fagocytosecapaciteit bij de Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) onderzocht. Er werd een verband vastgesteld tussen het percentage fagocytose en de fagocytose-index. De optimale incubatieduur waarbij de fagocytosetest bij Afrikaanse meerval dient uitgevoerd werd eveneens bestudeerd.

## **MATERIAAL en METHODEN**

De methode beschreven door LERNOUT (1992) voor Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) werd als leidraad gebruikt voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit op zeevis. Voor wat de proefdieren betreft werd beroep gedaan op vrouwelijke schar (*Limanda limanda*) > 24cm die afkomstig waren van het Belgisch continentaal plat. Vooreerst werden een aantal experimenten uitgevoerd om de percoll-gradiënten voor de scheiding van de macrofagen en granulocyten te optimaliseren. Met behulp van de gewijzigde methode werd de fagocytosecapaciteit op scharren uitgetest die reeds een tiendal dagen in aquarium in leven werden gehouden.

De mogelijkheid werd eveneens onderzocht om de fagocytosecapaciteit te bepalen bij op zee gedode vissen en op vissen die levend naar het labo worden gebracht. Het doel van het experiment was de invloed van de overbrenging uit zee van de kopnier in een aangepast medium en van levende vis op de fagocytosecapaciteit van schar vast te leggen. Hiervoor werd beroep gedaan op het schoolschip "Broodwinner 029". De duur van de overbrenging naar het lab bedroeg 4 uur.

Uiteindelijk werd de invloed van het paaien op de fagocytosecapaciteit bij schar nagegaan. De overleving van de geïsoleerde cellen werd met trypaanblauwoplossing getest. Het percentage cellen die fagocyteren en de fagocytoseindex werden na 13 uur, 18 uur en 30 uur bepaald. De fagocytosetest werd met behulp van gistcellen uitgevoerd. De temperatuur gedurende de incubatieperiode werd 2°C boven de temperatuur van het zeewater ingesteld. De bepaling van de bloedparameters bij schar omvatte voornamelijk de erythrocyten en de leucocyten waarbij de procentuele verhouding van de monocyt, lymfocyt en granulocyt werden bepaald. Dit experiment werd vlak voor en kort na het paaien verricht. De resultaten van deze dubbelproef zijn opgenomen in de tabellen 1 en 2 en de figuren 1 tot 4.

## **RESULTATEN en BESPREKINGEN**

Uit de experimenten waarbij de percoll - gradienten voor de scheiding van de leucocyten bij schar werd onderzocht gaf de combinatie :  $d = 1,02$ ;  $d = 1,05$  en  $d = 1,06$  de beste resultaten. Bij de percoll-gradiënt  $d = 1,02$  is duidelijk een witte band te vinden die voornamelijk uit lymfocyt bestaat. Bij de percoll-gradiënt  $d = 1,05$  vindt men een laag cellen die voornamelijk granulocyt en macrofagen omvat. Deze bevinding staat in contrast met de dichtheden die LERNOUT (1992) bij meerval heeft gebruikt.

De bekomen resultaten van de fagocytosecapaciteit bij schar die een tiendal dagen in aquarium werden gehouden waren moeilijk te interpreteren. Bij de ene vis treedt fagocytose op en bij de andere niet. Er werd eveneens vastgesteld dat de fagocyten snel afstierven gedurende het experiment. Bij het bloedonderzoek van de aquariumvis werd naast een gevoelige stijging van het aantal leucocyten ook een procentuele stijging van de monocyt (23%) en de granulocyt (17,5%) vastgesteld.

Deze gegevens wijzen op een hoge mate van stress waarin de bemonsterde aquariumvissen zich bevonden. De aanpassingsperiode (10 dagen) van de vis in het aquarium was blijkbaar te kort om experimenten in verband met de fagocytose capaciteit te kunnen uitvoeren.

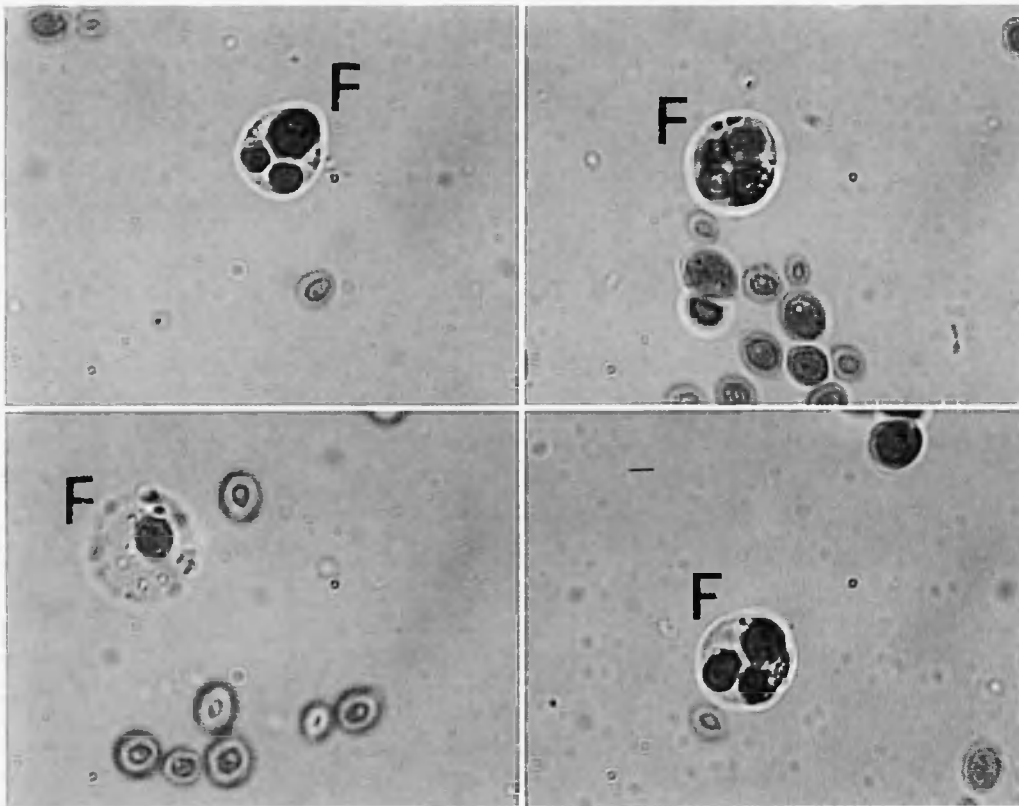


Foto 1 : Fagocytose (F) van gistcellen door uitgezuiverde macrofagen, afkomstig van de kopnier van schar (*Limanda limanda*). Vergroting x 1250.

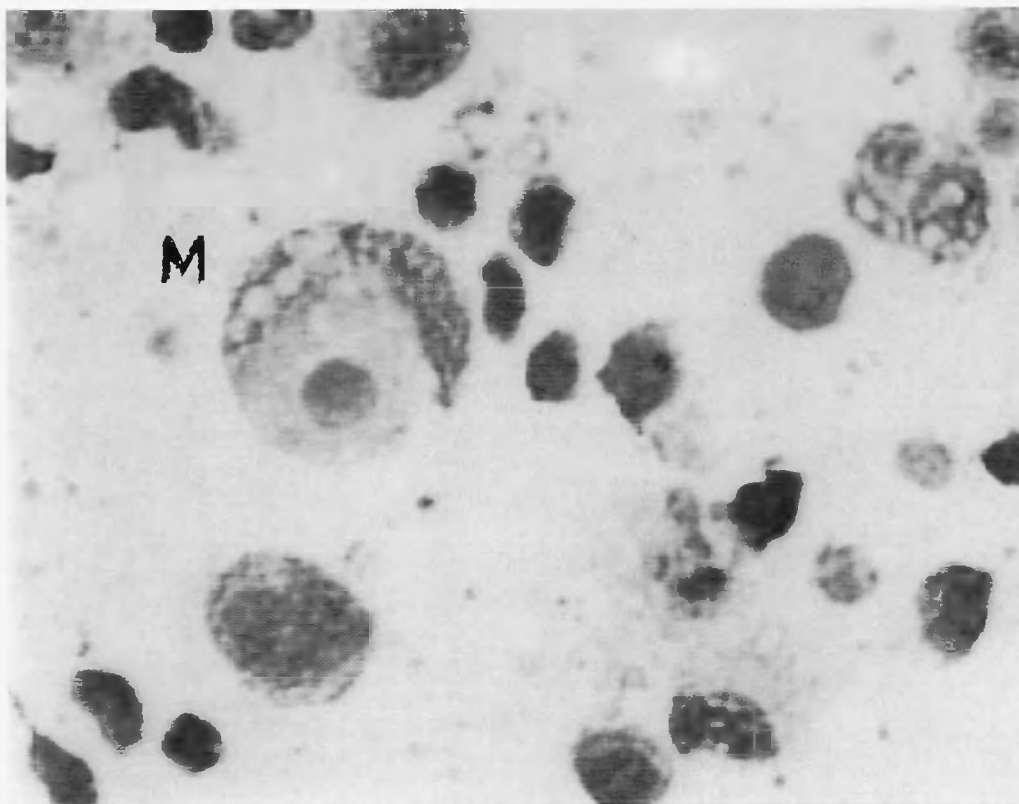


Foto 2 : Uitstrijkje van weefsel van de kopnier van schar met het voorkomen van macrofagen (M). Vergroting x 6000.

Daar bij de gestresseerde aquariumvis moeilijkheden ontstaan om de fagocytose capaciteit te onderzoeken en te interpreteren werd overgegaan tot een nieuw experiment waarbij de scharren rechtstreeks uit zee werden getest.

Aan boord van het vaartuig worden de kopnieren van de scharren met steriel dissectiemateriaal verwijderd en zonder verdere behandeling bewaard in gekoelde (4°C) proefbuisjes die gevuld zijn met 5 ml RPMI - HEP - 90%-medium. De proefbuisjes worden daarna in een met ijs gekoelde thermosfles gebracht. Pas in het laboratorium worden de cellen van de kopnieren met een gecoate stamper verticaal doorheen een draadnetje geduwd. Deze laatste behandeling werd ook aan boord van het vaartuig uitgevoerd, doch diende achterwege gelaten te worden. Er werd namelijk vastgesteld dat de fagocyterende cellen van de scharren reeds na enkele uren afsterven.

Uiteindelijk werd een protocol voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij zeevis opgesteld (zie bijlage). Het eerste deel van het protocol behandelt het onmiddellijk starten van het experiment aan boord van een commerciële kustvaartuig en het tweede deel de testen die in het laboratorium worden verricht. De maximum toegelaten tijd tussen de behandeling van de kopnier aan boord van het vaartuig en het starten van de fagocytosetest in het labo is 8 uur. Er werd tevens vastgesteld dat de fagocytose-capaciteit lichtjes hoger lag bij de vissen die pas in het laboratorium worden gedood (tabel 1).

De gemiddelde waarden voor de fagocytosecapaciteit bij schar lagen aanzienlijk lager vlak voor het paaien (stadium 6,7) dan vlak na het paaien. Het is bekend dat het paaien zelf gepaard gaat met een verhoging van "stress" bij schar. Dit gegeven leidt tot een significante stijging van de fagocytosecapaciteit van de macrofagen (figuren 1 tot 4). Na het paaiproces werd een significante verhoging van het totaal aantal leucocyten per  $\mu$ l vastgesteld. Hierdoor zijn heel wat jonge actieve macrofagen voorhanden om de fagocytose uit te voeren. De verhouding van de monocyt, lymfocyt en granulocyt bleef na het paaien echter ongewijzigd (tabel 2).

Er werd tevens vastgesteld dat er een verband bestaat tussen de fagocytosepercentage en de fagocytoseindex, namelijk als de fagocytosepercentage stijgt, stijgt ook de fagocytose index bij schar. Tevens werd uit de evolutie van de fagocytosecapaciteit bij schar afgeleid, de incubatieduur na 24 uur te beëindigen.

Identificatie vissen		Fagocytose (%)			Fagocytose index		
		13 uur	18 uur	30 uur	13 uur	18 uur	30 uur
<b>Experiment 1</b>							
Datum	22-apr-96						
Geslacht	vr						
Lengteklasse	>24cm						
Temperatuur zeewater	8°C						
Stadium gonade	6à7						
Diepte	15m						
Vis 1*		12	19	23	0,31	0,45	0,58
Vis 2*		12	18	20	0,33	0,51	0,57
Vis 3*		4	1	1	0,12	0,01	0,01
Vis 4*		8	24	32	0,16	0,68	0,88
<b>Gemiddeld (1,2,4)</b>		<b>10,7</b>	<b>20,3</b>	<b>25</b>	<b>0,27</b>	<b>0,55</b>	<b>0,68</b>
SD		1,9	2,6	5	0,07	0,09	0,14
Vis 5**		13	21	26	0,24	0,58	0,74
Vis 6**		14	22	29	0,3	0,53	0,74
<b>Gemiddeld (5,6)</b>		<b>13,5</b>	<b>21,5</b>	<b>27,5</b>	<b>0,27</b>	<b>0,56</b>	<b>0,74</b>
SD		0,5	0,5	1,5	0,03	0,03	0
<b>Experiment 2</b>							
Datum	6-mei-96						
Geslacht	vr						
Lengteklasse	>24cm						
Temperatuur zeewater	8°C						
Stadium gonade	leeg						
Diepte	15m						
Vis 7*		28	29	47	0,66	0,68	1,31
Vis 8*		32	35	37	0,75	0,82	1,72
Vis 9*		32	34	38	0,69	0,78	1,1
Vis 10*		27	38	32	0,64	0,84	0,84
<b>Gemiddeld (7,8,9,10)</b>		<b>29,8</b>	<b>34</b>	<b>38,5</b>	<b>0,69</b>	<b>0,78</b>	<b>1,24</b>
SD		2,3	3,2	5,4	0,04	0,06	0,32
Vis 11**		24	37	34	0,5	0,77	0,93
Vis 12**		39	43	56	0,94	0,96	1,7
<b>Gemiddeld (11,12)</b>		<b>31,5</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>0,72</b>	<b>0,87</b>	<b>1,32</b>
SD		7,5	3	11	0,22	0,1	0,39

Tabel 1 : Fagocytose (%) en fagocytose index bij schar(voor en na paaien) in functie van de incubatietijd

\* = Vissen waarvan de kopnier reeds aan boord werd behandeld

\*\* = Vissen levend meegenomen, waarvan de kopnier in het labo werd behandeld

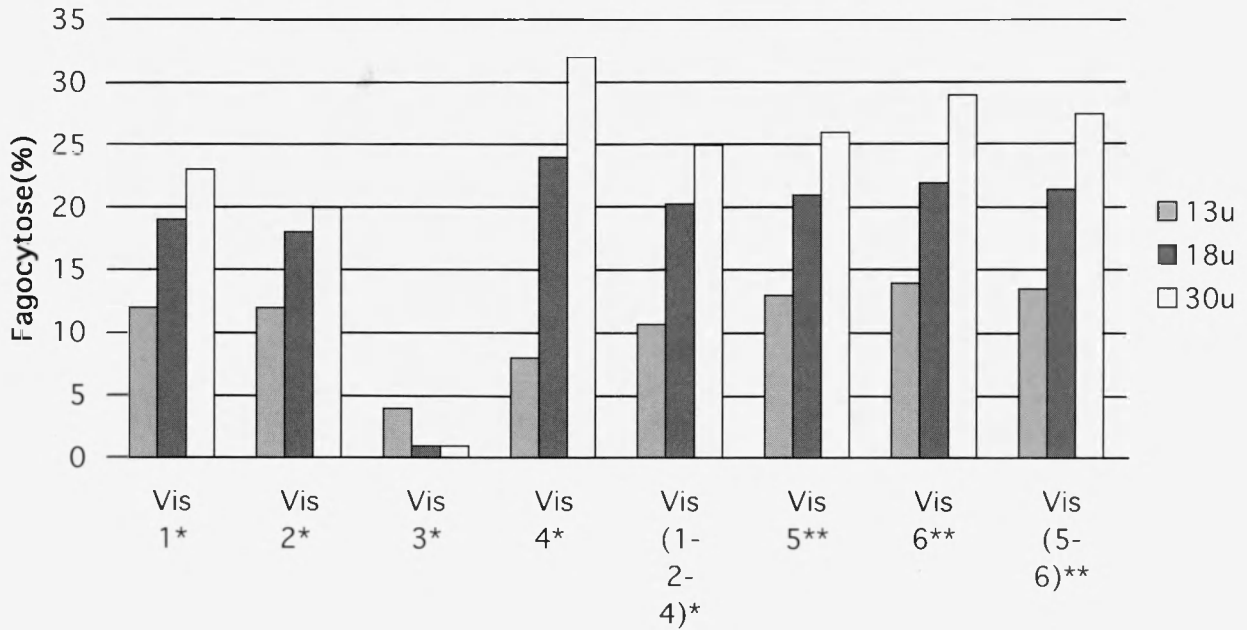
Identificatie vissen	HC (%)	R.B.C\µl	Leucoc.\µl	Monoc.(%)	Lymfoc.(%)	Granuloc.(%)	HG g/dl
<b>Experiment 1</b>							
Datum	22-apr-96						
Aantal scharren	6						
Geslacht	vr						
Lengteklasse	>24cm						
Stadium gonade	6à7						
Conditiefactor	0,98±0,15						
Vis 1	34	2112000	10312	5	92	3	5,13
Vis 2	37	2112000	4219	4	91	5	4,33
Vis 3	30	1488000	6250	5	90	5	3,08
Vis 4	33	2416000	10625	4	92	2	4,26
Vis 5	20	1168000	4063	6	92	2	1,91
Vis 6	22	1280000	5625	5	91	4	0,85
<b>Gemiddeld</b>	<b>29,3</b>	<b>1762666</b>	<b>6849</b>	<b>4,8</b>	<b>91,3</b>	<b>3,5</b>	<b>3,26</b>
SD	6,3	471336	2670	0,7	0,7	1,3	1,49
<b>Experiment 2</b>							
Datum	6-mei-96						
Aantal scharren	6						
Geslacht	vr						
Lengteklasse	>24cm						
Stadium gonade	leeg						
Conditiefactor	0,87±0,07						
Vis 7	30	1504000	>100000	5	91	4	6,56
Vis 8	32	1664000	19218	4	92	4	4,29
Vis 9	18	1184000	4687	7	89	4	1,34
Vis 10	42	2144000	20000	3	95	2	10,3
Vis 11	14	1072000	>100000	5	93	2	5,69
Vis 12	22	1632000	14218	5	92	3	2,71
<b>Gemiddeld</b>	<b>26,3</b>	<b>1533333</b>	<b>43020</b>	<b>4,8</b>	<b>92</b>	<b>3,2</b>	<b>5,14</b>
SD	9,4	350106	40597	1,2	1,8	0,9	2,88

**Tabel 2 : Invloed van het paaien op de bloedparameters bij schar**

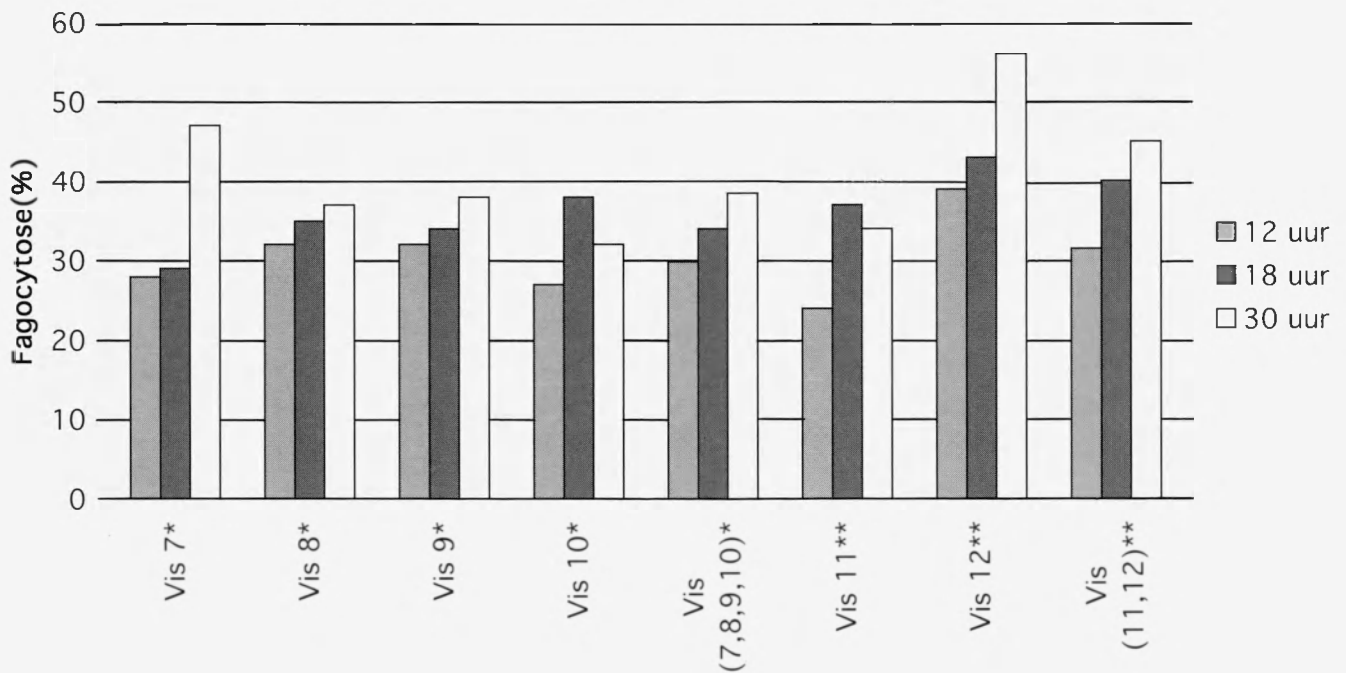
HC : Hematocrietwaarde  
RBC : Erythrocyten\µl  
HG : Hemoglobineconcentratie



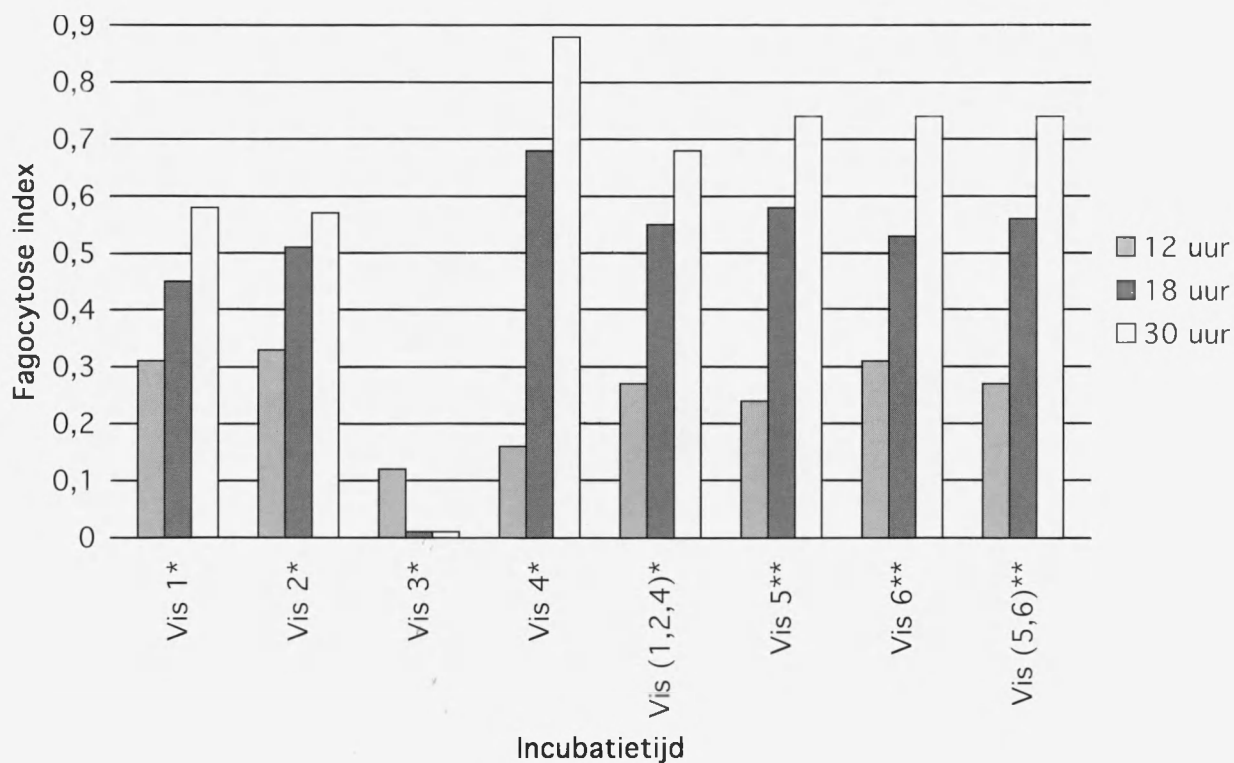
Figuur 1 : Evolutie van het fagocytose percentage bij schar (voor het paaien) in functie van de incubatietijd



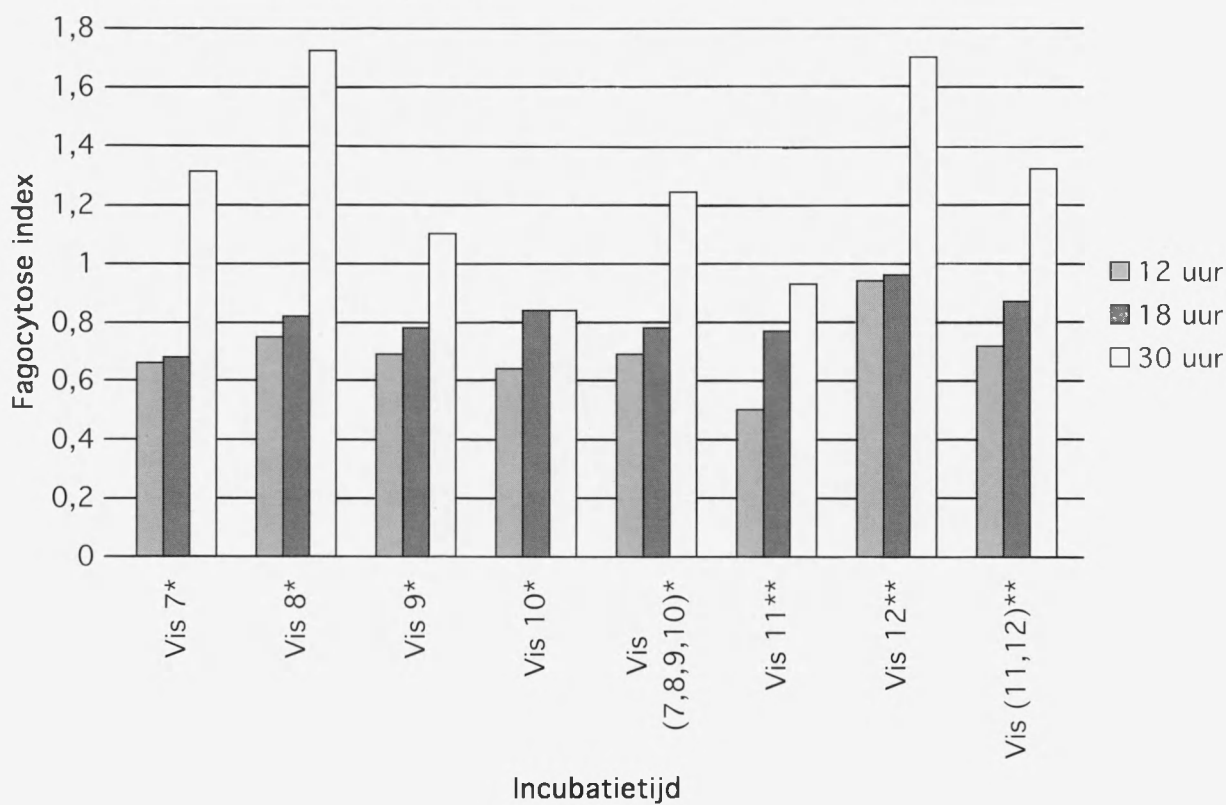
Figuur 2 : Evolutie van het fagocytose percentage bij schar(na het paaien) in functie van de incubatietijd



Figuur 3 : Evolutie van de fagocytose index bij schar(voor het paaien) in functie van de incubatietijd



Figuur 4 : Evolutie van de fagocytose index bij schar(na het paaien) in functie van de incubatietijd



**PROTOCOL** (behandeling van het monster aan boord van het vaartuig en in het laboratorium)

### **Staalname aan boord van het vissersvaartuig.**

#### **a. Bloedafname**

- de bloedafname gebeurt onmiddellijk na de vangst aan boord van het vaartuig. Enkel levende vissen waarvan het bloed nog niet gestold is, komen in aanmerking.
- de omstandigheden waarin gewerkt wordt, moeten zo steriel mogelijk zijn. Eerst wordt de kieuwboog ontsmet met 70% isopropylalcohol en drooggewreven met absorberend papier.
- na de bloedafname worden de verpakte Tapvalbuisjes bewaard ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) in een met ijs gekoelde thermosfles.

#### **b. Dissectie van de kopnier**

- een overdosis phenoxy-ethanol toedienen om de vissen te doden.
- de huid van de vissen ontsmetten met isopropylalcohol 70%
- de kopnier met steriel dissectiemateriaal verwijderen en bewaren op  $4^{\circ}\text{C}$  in proefbuisjes die gevuld zijn met 5ml RPMI-HEP-90%-medium. Tijdens het disseceren wordt het materiaal regelmatig ontsmet met isopropylalcohol 70%.
- een uitstrijkje maken van de kopnier voor het microscopisch onderzoek.
- de bemonsterde vissen worden dan in genummerde plasticen zakken gestopt voor verdere identificatie in het laboratorium.

### **Behandeling van het staal in het laboratorium**

- na het aanleggen van het vaartuig worden de stalen onmiddellijk naar het laboratorium gebracht voor verder onderzoek. Het geslacht, rijpingsstadium van de gonaden, lengte, gewicht en het voorkomen van in- en uitwendige aandoeningen worden geregistreerd.
- de kopnier wordt door een gecoat (antiklonteringsmedium van Sigma) draadnetje met een gecoate stamper onder toevoeging van RPMI-HEP-90%-medium geduwd.
- de bekomen celsuspensie wordt in een plasticen gecoate centrifugeerbuis van 15ml met behulp van een gecoate pasteurpipet overgebracht.
- het afcentrifugeren (10min bij 350g) en het terug in oplossing (5ml RPMI-HEP-90%-medium) brengen van de cellen wordt drie maal herhaald. Het waswater wordt telkens verwijderd.
- twee ml van de percoll-oplossingen  $d=1,02$ ;  $d=1,05$  en  $d=1,06$  worden zonder mengen één voor één in een schuin gehouden centrifugeerbuis van 15ml aangebracht. Daarna wordt de gewassen celsuspensie voorzien van 0,5ml RPMI-HEP- 90%-medium bovenop de gradiënt gepipetteerd.
- het gekoeld centrifugeren wordt op  $4^{\circ}\text{C}$  en gedurende 30 minuten bij 700 g uitgevoerd.
- de tweede laag met granulocyten en makrofagen van de gradiënt halen met een gecoate pasteurpipet en het aantal cellen per  $\mu\text{l}$  tellen met behulp van de telkamer van Kova.
- de overleving van de cellen wordt bepaald met trypaanblauwoplossing.
- de bepaling van de fagocytosecapaciteit wordt uitgevoerd met gistcellen. De verhouding gistcellen tot fagocyterende cellen bedraagt 5,5\1.
- de celsuspensie in 5% vol %  $\text{CO}_2$  gedurende 24 uur op  $2^{\circ}\text{C}$  boven het zeewatertemperatuur laten incuberen. De fagocytosepercentage en de fagocytoseindex bepalen.

## BESLUIT

Uit het onderzoek van de percoll-gradienten voor de scheiding van de leucocyten bij schar, gaf de combinatie  $d=1,02$ ,  $d=1,05$  en  $d=1,06$  de beste resultaten.

De bepaling van de fagocytosecapaciteit op wilde schar, die een tiental dagen in aquarium verbleef, bleek onbetrouwbaar. Een langere aanpassingsperiode is noodzakelijk om zinvolle proefnemingen in verband met stressbepalingen op vis te kunnen uitvoeren.

Het inzetten van de bepaling van de fagocytosecapaciteit van de macrofagen van de kopnier van de op zee gedode, of naar het laboratorium overgebrachte levende schar is mogelijk op voorwaarde dat de incubatietest niet langer dan 8 uur na de vangst wordt uitgesteld.

Het paaien van schar bleek de fagocytosecapaciteit van de macrofagen bij schar positief te beïnvloeden. Er werd tevens een aanzienlijke verhoging van de leucocyten vastgesteld. De procentuele verhouding van de lymfocyten, granulocyten en monoccyten bleef ongewijzigd.

## REFERENTIES

DARNELL *et al.*, 1990. Molecular cell biology. Second edition. New York. Freeman and company. pp. 555 - 560.

den OTTOLANDER G.J.H., 1989. Interne geneeskunde. Negende herziene druk. Utrecht. Bohn, Scheltema en Holkema. 8 - 10 en pp. 46 - 49.

GREENSBERGS S. and SILVERSTEIN, 1993. Phagocytosis. Fundamental immunology. Third edition edited by William E. Paul. New York. Raven Press. Lid. chapter 27, pp. 941 - 949.

LERNOUT M., 1992. Invloed van voedingslipiden op de gewichtstoename en de fagocytosecapaciteit bij de Afrikaanse Meerval (*Clarias gariepinus* Burchell 1822). Eindverhandeling (onuitgegeven) o.l.v. prof F.Ollevier. Leuven, K.U.L.

MATHEWS ELAINE S., *et al.*, 1990. Assays of immune function in fish macrophages. Techniques used as indicators of environmental stress. Techniques in Fish Immunology. Fish Immunology Technical Communications 1. Edition by Stolen J.S *et al.*

PLASMAN N. and B.VRAY, 1993. Mouse peritoneal macrophages: characterization of functional subsets following Percoll density gradients. Res. Immunol. 144, pp. 151 - 163.

PLASMAN N. and B. VRAY, 1994. Quantification of bacterial phagocytosis by flow cytometry and spectrofluorimetry. Journal of Immunology Methods. 174, pp. 195 - 202.

RIOTT I. *et al.*, 1989. Immunology. Second edition. London. New York. Churchill livingstone. Gower Medical Publishing. pp. 1.1 -1.5, and pp. 15.2 - 15.9.

SANTAREM M. and A. FIGUERAS, 1994. Kinetics of phagocytic activity, plaque - forming cells and specific agglutinins of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunised with O antigen of *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida*. Fish and Shellfish Immunology. 4, pp. 527 - 537.

